

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020010051095 A
(43)Date of publication of application:
25.06.2001

(21)Application number: 1020000061231
(22)Date of filing: 18.10.2000

(71)Applicant: KOREA RESEARCH
INSTITUTE OF
BIOSCIENCE AND
BIOTECHNOLOGY
(72)Inventor: KIM, GI YEON
KWAK, SANG SU
KWON, SEOK YUN
LEE, HAENG SUN

(51) Int. Cl.

C12N 15 /29

(54) PEROXIDASE GENOME GENE DERIVED FROM *LPOMOEA BATATAS* AND PROMOTER THEREOF

(57) Abstract:

PURPOSE: A peroxidase genome gene derived from *Lpomoea batatas* and a promoter thereof are provided, therefore the peroxidase genome gene can be effectively used in the development of environmental stress resistant plants.

CONSTITUTION: The peroxidase genome gene is represented by sequence ID No. 1. The promoter is represented by sequence ID No. 2 and its activity is induced by environmental stresses, in which the environmental stresses can be injury, active oxygens, heat, water, temperature, salts, air pollution, ultraviolet rays or heavy metals. The DNA consists of the promoter of sequence ID No. 2 and DNA sequence encoding useful products, in which the DNA sequence encoding useful products recognizes stresses of ABA, methyl jasmonate, injury, low oxygen concentration, active oxygen, heat or nitrogen. Tobacco callus (KCTC 0875BP) producing useful products by inducing of environmental stresses is prepared by transformation of an expression vector containing the promoter of sequence ID No. 2 and DNA sequence encoding useful products.

<pre> 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 579 580 581 582 583 584 585 586 587 587 588 589 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 679 680 681 682 683 684 685 686 687 687 688 689 689 690 691 692 693 694 695 696 697 697 698 699 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 779 780 781 782 783 784 785 786 787 787 788 789 789 790 791 792 793 794 795 796 797 797 798 799 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 879 880 881 882 883 884 885 886 887 887 888 889 889 890 891 892 893 894 895 896 897 897 898 899 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 979 980 981 982 983 984 985 986 987 987 988 989 989 990 991 992 993 994 995 996 997 997 998 999 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1087 1088 1089 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1097 1098 1099 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1187 1188 1189 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1196 1197 1198 1198 1199 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1287 1288 1289 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1296 1297 1298 1298 1299 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1387 1388 1389 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1396 1397 1398 1398 1399 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1487 1488 1489 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1496 1497 1498 1498 1499 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1587 1588 1589 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1596 1597 1598 1598 1599 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1687 1688 1689 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1696 1697 1698 1698 1699 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1787 1788 1789 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1796 1797 1798 1798 1799 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1887 1888 1889 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1896 1897 1898 1898 1899 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1987 1988 1989 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1996 1997 1998 1998 1999 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2019 2020 2021 2022 20</pre>
--

COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (20010811)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (20040611)

Patent registration number (1004372660000)

BEST AVAILABLE COPY

Date of registration (20040614)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

공개특허특2001-0051095

(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. 6
 C12N 15/29

(11) 공개번호 특2001-0051095
 (43) 공개일자 2001년06월25일

(21) 출원번호 10-2000-0061231
 (22) 출원일자 2000년10월18일

(30) 우선권주장 10199900473611999년10월29일대한민국(KR)

(71) 출원인 한국생명공학연구원 복성해
 대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자 곽상수
 대전광역시유성구전민동464-1엑스포아파트307동306호
 이행순
 대전광역시유성구어은동한빛아파트126동502호
 권석윤
 대전광역시유성구어은동99한빛아파트102동1802호
 김기연
 대전광역시중구중촌동현대아파트106동504호

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 없음

(54) 고구마 유래 페옥시다제 게놈 유전자 및 그의 프로모터

요약

본 발명은 스트레스 유도성 프로모터 (stress inducible promoter)에 관한 것으로서, 구체적으로 고구마 (*Ipomoea batatas*) 식물체에서 유도된 배양세포로부터 환경 스트레스 조건에서 강하게 발현이 유도되는 고구마의 페옥시다제 (peroxidase, POD)를 암호하는 신규 유전자 및 그의 프로모터에 관한 것이다. 본 발명의 페옥시다제 유전자 프로모터의 전체 또는 일부는 세포, 식물체, 미생물 및 박테리아 등의 형질전환체 개발에 이용되어 환경 스트레스에 대해 내성을 가지는 내성식물체 개발과 유용성분을 대량으로 생산할 수 있는 형질전환 생물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도

도3

명세서

- 〈110〉 Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- 〈120〉 A peroxidase genomic gene derived from *Ipomoea batatas* and a promoter thereof
- 〈130〉 0p-09-48
- 〈160〉 4
- 〈170〉 KopatentIn 1.55
- 〈210〉 1
- 〈211〉 3741
- 〈212〉 DNA
- 〈213〉 *Ipomoea batatas*
- 〈220〉

〈221〉 CDS

⟨222⟩ (1829)..(2155)

〈223〉 exon I

〈220〉

〈221〉 CDS

⟨222⟩ (2898)..(3092)

<223> exon II

〈220〉

〈221〉 CDS

⟨222⟩ (3190)..(3741)

<223> exon III

<400> 1

tttcttaatc ttacatttc ctttgacc atg gct tcc att gtg agt cggttc 1852
Met Ala Ser Ile Val Ser Arg Leu
1 5
agt ctt gcg cta agc ctc ata gct cta gct ggc tac tcc att 1900
Ser Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Leu Ala Leu Ala Gly Tyr Ser Ile
10 15 20
tac cag cac aca cag tca gcc atg gag agc cag ccc atc aag gct ctc 1948
Tyr Gln His Thr Gln Ser Ala Met Glu Ser Gln Pro Ile Lys Ala Leu
25 30 35 40
ccg gcg tgg cta cag ctc ccc acg ttc caa tct gcc aac gtg tta tcg 1996
Pro Ala Trp Leu Gln Leu Pro Thr Phe Gln Ser Ala Asn Val Leu Ser
45 50 55
tat tat ccg agt ggc cgc aaa tcc tcc ccc gcc ggc atg ctt tcc gac 2044
Tyr Tyr Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Pro Ala Gly Met Leu Ser Asp
60 65 70
gaa gct tgc gtg ttc tcc gcc gtt aaa gaa gtt gtc gac gcc gcc atc 2092
Glu Ala Cys Val Phe Ser Ala Val Lys Glu Val Val Asp Ala Ala Ile
75 80 85
gat aac gaa act cgc atg ggg gct tcc ctc att cgt ctc ttc cac 2140
Asp Asn Glu Thr Arg Met Gly Ala Ser Leu Ile Arg Leu Phe Phe His
90 95 100
gat tgc ttt gtc gat gtacg tatagtatac atataattat gtaaaaccta 2190
Asp Cys Phe Val Asp
105
tatatatata tatatacatg cacaataagt ttataatact aataatatacc 2250
catactttt gcatatcatt atataatatta acacgattat attaaaaacc aataatata 2310
tatatatata tatatagtta actatcttt cttcacitc ttatcactt ttaaaattgt 2370
taaatctaaa aattaattgt tattttattt aatttttctt atttctatt ttgtttaaag 2430
acttaattat actattattt aactgggcgtg gtaactttcc gtaatattt ttatttaac 2490
aattgtacca attaaaacca attgtaccaaa tagtacgtaa aagatcaaag tgacataaac 2550
cagcttaagt ttttaatg gacgaactca aaacaaaaaa gtaatatgt aatttcggta 2610
gagaagtcaa attaaaaatt tcatagttt caaatcaatt gtttatcaa cccagctagg 2670
ttgnctattt caaaaactaa tttagacattt gttgtcatga aacattacgt taaaacaaaa 2730
gtcatcaccc acctcgctt ataaatgggt tacctaagtt atcacacgtt cctgtcgaac 2790
ttacacgcca aacatgtcaa tatgtcaaat gctttaatga aaaatattat tagattatta 2850
tttatctaat actaaatttt cttcttcgtt aaaaatttgt ttttattttt ggttgtt gat 2906
Gly Cys Asp
1
gca ggg ctt ctt ttg aat gat acg gcg acg ttc aca ggg gaa caa act 2954
Ala Gly Leu Leu Leu Asn Asp Thr Ala Thr Phe Thr Gly Glu Gln Thr
5 10 15
gca ttt ggc aat ctt aat tcc gtg aga ggg ttt gag gtt ata gaa caa 3002
Ala Phe Gly Asn Leu Asn Ser Val Arg Gly Phe Glu Val Ile Glu Gln
20 25 30 35

gct aaa cag aat gca gta gct aaa tgt gcc gat aca ccc gta tct tgt 3050

Ala Lys Gln Asn Ala Val Ala Lys Cys Ala Asp Thr Pro Val Ser Cys

40 45 50

gct gac att tta tct att gct gct cgt gat tct ttc gaa cgg gtaagtct 3100

Ala Asp Ile Leu Ser Ile Ala Ala Arg Asp Ser Phe Glu Arg

55 60 65

tcaatatcggttataatgttactaataatgttacatgttagatcatgtattta 3160

tttattttctttgttattttacattcaacagtttagtggagaacaatactactgtt 3213

Phe Ser Gly Ala Thr Tyr Thr Val

1 5

act tta ggg cga ctc gat gcg aga acc gcg aac tta acc gga gct aat 3261

Thr Leu Gly Arg Leu Asp Ala Arg Thr Ala Asn Leu Thr Gly Ala Asn

10 15 20

acc cag ctt gtc gga cca tcg gaa aac ttg act gaa caa gtc agg aaa 3309

Thr Gln Leu Val Gly Pro Ser Glu Asn Leu Thr Glu Gln Val Arg Lys

25 30 35 40

ttt ggc atc aaa gga ttt aac gag agg gaa ttg gtc gcc ttg ttg ggt 3357

Phe Gly Ile Lys Gly Phe Asn Glu Arg Glu Leu Val Ala Leu Leu Gly

45 50 55

tca cac acg cta ggg ttt gcc aga tgt ccg gtt tta tgt gac aac aga 3405

Ser His Thr Leu Gly Phe Ala Arg Cys Pro Val Leu Cys Asp Asn Arg

60 65 70

aac att aac ccg gtt cgg gtc ccc ggt ctg caa tgc aac tgt cct gta 3453

Asn Ile Asn Pro Val Arg Val Pro Gly Leu Gln Cys Asn Cys Pro Val

75 80 85

act aat act gac ccg ggt ttg gtc ggg ctg gac ccc aca ccc gat aca 3501

Thr Asn Thr Asp Pro Gly Leu Val Gly Leu Asp Pro Thr Pro Asp Thr

90 95 100

ttc gac caa cgt tat tac tct gac cta gtc agc ggc caa ggc ctc ctg 3549

Phe Asp Gln Arg Tyr Tyr Ser Asp Leu Val Ser Gly Gln Gly Leu Leu

105 110 115 120

ttt tcc gac caa cag ctg atg aac agc acc acc acc agc gac gcc gtg 3597

Phe Ser Asp Gln Gln Leu Met Asn Ser Thr Thr Ser Asp Ala Val

125 130 135

acg acg tac cgt gac tcc ata gac acc ttc ctt gcc gac ttc gcc gcc 3645

Thr Thr Tyr Arg Asp Ser Ile Asp Thr Phe Leu Ala Asp Phe Ala Ala

140 145 150

gcc atg gtc aag atg agc aac ctg cct ccg tcc gcc gga gtt gag ctc 3693

Ala Met Val Lys Met Ser Asn Leu Pro Pro Ser Ala Gly Val Glu Leu

155 160 165

gaa atc cgt gac gtc tgc agc cgg gtg aat gac gtc tct gtt gca tcc 3741

Glu Ile Arg Asp Val Cys Ser Arg Val Asn Asp Val Ser Val Ala Ser

170 175 180

<210> 2

〈211〉 1828

〈212〉 DNA

〈213〉 *Ipomoea batatas*

<400> 2

〈210〉 3

〈211〉 27

<212> DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 forward primer 1

<400> 3

acgcgtcgac cttactttgt gattcta 27

〈210〉 4

<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer 2
<400> 4

acgcgtcgac aatggacgaa ttattagt 28

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer 3
<400> 5

acgcgtcgac ggtcggaaacg tttttt 26

<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer 4
<400> 6

acgcgtcgac ccatgtatcg atcgata 27

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer 5
<400> 7

acgcgtcgac aatattttgt ctgtatt 27

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer 1
<400> 8

cgggatccgg tcaaaggaaa at 22

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NPTII primer 1

<400> 9

gaggcttattc ggcttagatg 19

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NPTII primer 2

<400> 10

atcgggagcg gcgataccgt a 21

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> promoter primer 1

<400> 11

ccattgatca gatcgata 18

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> promoter primer 2

<400> 12

ggtaaaagga aatgtaa 19

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의, 고구마의 퍼옥시다제 유전자 swpa2를 포함하는 게놈 DNA를 분리하기 위하여 서던블럿 (southern blot)으로 분석한 결과를 나타낸 것이고, 도 2a는 본 발명의, 고구마의 퍼옥시다제를 코딩하는 게놈 유전자 SWPA2의 염기서열과 이로부터 번역된 아미노산 서열을 나타낸 것이고, 도 2b는 도 2a의 퍼옥시다제를 코딩하는 게놈 유전자 SWPA2의 염기서열과 이로부터 번역된 아미노산 서열이 계속되는 것이고, 도 3은 고구마 퍼옥시다제를 코딩하는 게놈유전자 SWPA2의 프로모터 영역의 염기서열을 나타낸 것이고, 도 4는 본 발명의 퍼옥시다제를 코딩하는 게놈 유전자 SWPA2의 프로모터 영역의 결실 돌연변이체를 제조하는 과정을 나타내는 모식도이고, 도 5는 본 발명의 프로모터 영역의 결실 돌연변이체를 이용한 transit assay 결과를 나타낸 것이고, 도 6은 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 형질전환 효모에서 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 7a는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 상처를 처리하지 않고 유도된 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 7b는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 상처를 처리한 후 유도된 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 8a는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 H₂O₂를 처리하지 않고 유도된 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 8b는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 H₂O₂를 처리한 후 유도된 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 9a는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 자외선을 조사하지 않고 유도된 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 9b는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 자외선을 조사한 후 유도된 GUS 활성을 측정한 결과이고, 도 10a는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체의 잎으로부터 유도된 캘러스를 GUS로 염색한 결과를 나타낸 것이고, A: pBS1314 B: pBS1824C; 대조군 D: pBI121도 10b는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체의 잎으로부터 유도된 캘러스의 GUS 활성을 측정한 결과이고, A: pBS1314 B: pBS1824C; 대조군 D: pBI121도 11a는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체의 잎으로부터 유도된 캘러스를 헌탁배양하여 그 세포의 세포생장 곡선을 나타낸 것이고, 도 11b는 본 발명의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체의 잎으로부터 유도된 캘러스를 헌탁배양하여 그 세포의 GUS 활성을 측정한 결과이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 신규한 프로모터 및 퍼옥시다제 유전자에 관한 것이다.

식물을 포함한 대부분의 생물은 병균, 해충, 바이러스 등의 생물학적 스트레스 뿐만 아니라 지구 환경 악화에 따라 생기는 각종 환경 스트레스를 받게 되면 생명유지에 필요한 필수 원소이지만 반응성이 높은 산소가 심각한 생리적인 장해 등을 유발하는 수퍼옥사이드 음이온 라디칼 (superoxide anion radical, O_2^-), 과산화수소 (hydrogen peroxide, H_2O_2), 수산화 라디칼 (hydroxyl radical) 등의 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)으로 변하게 된다. 따라서 생체 내에는 이러한 활성 산소를 제거하는 시스템으로 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 (SOD: EC 1.15.1.1), 퍼옥시다제 (peroxidase, 이하 "POD"라 약칭함), 카탈라제 (catalase, CAT) 등의 고분자 항산화 효소와 비타민 C, 비타민 E, 글루타チ온 (glutathion) 등의 항산화 물질 등이 많이 존재하게 된다.

퍼옥시다제는 전자공여체의 존재 하에 과산화수소를 환원시키는 효소로서 식물세포에 광범위하게 존재하는 것으로 알려져 있다. 퍼옥시다제는 효소반응이 민감하기 때문에 각종 임상시험용 시약으로 이용되는 등 상업적으로 중요한 효소일 뿐 아니라, 식물체가 각종 외부적 스트레스에 반응하는데 중요한 역할을 하기 때문에 많은 관심의 대상이 되고 있다. 일반적으로 식물 퍼옥시다제는 각종 환경 스트레스에 의해 그 활성이 증가되며, 특히 식물 배양세포는 높은 산화적 스트레스에서 배양되기 때문에 퍼옥시다제 활성이 매우 높다. 그 중에서도 고구마 배양세포는 지금까지 보고된 어느 식물체의 배양세포보다도 퍼옥시다제를 대량으로 생산한다는 것이 보고되었다 (Phytochemistry, 39, 981-984, 1995).

현재까지 서양겨자무, 보리, 밀, 유채, 애기장대풀, 담배, 시금치, 벼 등 약 20종의 식물로부터 유래된 일부 식물의 퍼옥시다제 동위효소를 코딩하는 유전자가 알려져 있다. 고구마의 퍼옥시다제 유전자가 대해서는 본 발명자들에 의해 처음으로 분리되어 보고되었는데, 고구마 배양세포로부터 분리된 산성 퍼옥시다제 swpa1 및 중성 퍼옥시다제 swpn1 유전자가 고구마 배양세포와 식물체 줄기에서 특이적으로 발현하며 계놈 내에 복수로 존재하는 특징이 있고 이의 전체 또는 일부를 세포, 식물체에 형질전환시킴으로써 퍼옥시다제를 안정적으로 대량생산할 수 있음을 보고하였다 (Mol. Gen. Genet., 255, 382-391, 1997).

또한, 본 발명자들은 고구마로부터 산성 퍼옥시다제 유전자 swpa2 (GeneBank Accession No. AF109124) 및 swpa3 cDNA (GeneBank Accession No. AF109123)를 분리하여 그 염기서열을 밝힌 바 있다. 이에 의하면, swpa2는 71개의 분비 웨프티드 (signal peptide)를 가지고 있고 swpa3는 66개의 분비 웨프티드를 가지고 있으며, swpa2와 swpa3는 각각 358개와 349개의 아미노산을 코딩하는 1246 bp와 1310 bp 크기의 염기서열을 갖는다. swpa2와 swpa3에 의해 발현되는 성숙 단백질의 등전점 (isoelectric point)은 각각 4.1과 4.3으로 이는 상기 유전자 모두가 산성 퍼옥시다제를 암호함을 나타낸다. 이들의 3'-말단 비번역영역 (untranslated region)에는 전형적인 폴리아데닐화 신호 (polyadenylation signal)인 AAUAAA와 poly(A)-꼬리 (poly(A)-tail)가 존재하는데, 특히 swpa2 유전자의 N-말단서열은 고구마 배양세포의 주성 분 동위효소 (A-2)와 완전히 일치하였다. 또한, 본 발명자들은 swpa2 유전자는 고구마 식물체 잎에 상처를 내거나 저온 처리 또는 오존처리를 한 경우에는 강하게 발현이 유도된 반면, swpa3 유전자는 식물체 잎에 상처를 준 경우에는 약하게 발현되었지만 저온처리 또는 오존처리를 한 경우에는 강하게 발현됨을 밝혔다 (Mol. Gen. Genet., 261, 941-947, 1999).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 고구마에서 유래된 퍼옥시다제의 계놈 DNA 및 그의 염기서열을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 다양한 환경 스트레스에 의해 유전자의 발현이 강하게 유도되는 프로모터를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 다양한 환경 스트레스에 대해 내성을 가지는 형질전환체 및 그의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 유용성분을 대량으로 생산할 수 있는 형질전환체 및 그의 제조방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 명세서에 기재된 용어, 기술 등은 특별한 한정이 없는 한, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 일반적으로 사용되는 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에 언급된 문현들은 모두 본 발명을 설명하기 위한 문현으로 본 명세서에 포함된다.

본 발명에서 "염기 서열의 변이체"는 생물학적 활성을 유지하면서 swpa2, SWPA2, 또는 SWPA2 프로모터의 염기서열에서 하나 이상의 염기가 치환, 결실 또는 부가되어 변경된 염기서열을 의미한다.

"단백질의 변이체"는 swpa2에 의해 코딩되는 퍼옥시다제 활성을 가지며, swpa2에 의해 코딩되는 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가되어 변경된 아미노산 서열을 의미한다.

"SWPA2 프로모터"는 서열번호 1의 1 내지 1314번 위치의 염기서열을 포함하며, 작동가능하게 연결된 유전자에 적절한 조건 하에서 전사활성을 부여하는 염기서열을 의미한다.

"SWPA2 프로모터의 활성단편"은 서열번호 1의 1 내지 1824번 위치의 염기 서열 중 일부를 포함하며, 작동가능하게 연결된 유전자에 SWPA2 프로모터 활성을 부여하는 염기서열을 의미한다.

"형질전환체"는 SWPA2 프로모터와 이것과 작동가능하게 연결되며 유용물질을 코딩하는 DNA 서열로 이루어지는 DNA 구조물(DNA construct)에 의해 형질전환된 세포 또는 식물체를 의미한다. 본 발명에서 형질전환체는 형질전환된 미생물, 동물세포, 식물세포, 형질전환된 동물 또는 식물체 및 이들로부터 유래된 배양세포 등을 포함한다.

"환경 스트레스"는 대상 생물에 스트레스로 작용하는 생물적 또는 미생물적 스트레스를 의미하며, 예를 들어 상처, 활성산소종, 열, 수분, 온도, 염, 대기오염, 자외선, 중금속 등에 의한 스트레스를 의미한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 고구마 유래 퍼옥시다제 유전자를 코딩하는 게놈 유전자 SWPA2 및 그의 염기서열을 제공한다.

본 발명의 SWPA2는 서열번호 1로 기재되는 염기서열 전체 또는 그것의 일부로 이루어지며 고구마 퍼옥시다제 swpa2를 코딩하는 엑손을 포함하는 DNA 서열이다.

상기 SWPA2는 고구마 게놈 DNA 라이브러리로부터 3차 스크리닝을 통해 swpa2와 판독구조 (ORF; Open Reading Frame)가 동일한 게놈 클론으로 선별되었으며 이를 천연 SWPA2라 명명하였다 (도 2 참조).

천연 SWPA2는 3개의 엑손과 2개의 인트론 및 프로모터 영역으로 이루어져 있는데, 상기 엑손의 염기서열은 swpa2 cDNA (GeneBank Accession No. AF109124)의 염기서열과 완전히 일치하였다. 고구마 퍼옥시다제 게놈 클론은 2개의 인트론 중 특히 첫 번째 인트론이 737 bp로 다른 식물종이 100 내지 300 bp인 것에 비해 상당히 긴 인트론을 포함하고 있으며, 각각의 인트론은 5'쪽이 GT로 시작하고 3'쪽이 AG로 끝나는 GT-AG의 법칙을 따르고 있다.

또한, 본 발명은 다양한 환경 스트레스에 의해 유전자의 발현이 유도되는 프로모터를 제공한다.

본 명세서에서 특별히 한정이 없는 한 SWPA2 프로모터는 SWPA2 프로모터 및 그것의 활성 단편을 포함하는 의미로 사용된다.

본 발명에서 SWPA2 프로모터는 서열번호 2로 기재되는 염기서열 전체 또는 그것의 일부로 이루어지며, 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열로 이루어진다. 한 예로, 본 발명에서 SWPA2 프로모터는 바람직하게는 서열번호 2의 염기서열 중 1 내지 1314번 또는 그것의 일부로 이루어지며, 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열로 이루어진다.

본 발명에 따른 프로모터는 환경 스트레스에 의해 강하게 발현되며, 고구마 유래 퍼옥시다제 게놈 유전자의 천연 SWPA2로부터 유래된다.

천연 SWPA2는 번역개시점의 상류에 프로모터 영역을 가지고 있는데, 이를 SWPA2 프로모터라 명명하였다. SWPA2 프로모터 영역을 Computational Biology & Informatics Laboratory의 Transcription Element Search Software (TESS)를 이용하여 염기서열 상의 특성을 분석한 결과, 상기 서열번호 2로 기재되는 염기서열로 이루어지며 전사개시를 위한 TATA box와 -895 위치에 CAAT box를 가진다 (도 3 참조).

전사조절 단백질의 부착부위로서, ABA, 메틸 자스모네이트 (methyl jasmonate), 자외선, 상처, 저산소증 등에 의해 조절되는 것으로 알려져 있는 (Williams, M. et al., 1992) G box는 NNNSACGTGNCM으로 기재되는 아미노산 서열을 가지는데 SWPA2 프로모터 영역의 -445와 -455 위치에 이와 유사한 영역 (motif)이 존재한다 (도 3 참조). 천연 SWPA2의 프로모터 영역 내의 G box와 전사개시점 사이에는 조직 특이적으로 발현되며 스트레스에 의해 발현이 유도되는 전사인자 (transcription factor)로 밝혀진 (Gidoni, D. et al., 1984) SP-1이 존재하고 있으며, 그 외에도 AAAATAA의 반복서열 (repeat sequence)이 6개 존재한다.

또한, 천연 SWPA2의 프로모터 영역은 서열번호 2의 염기서열 내 -1170와 -1188 사이에 AGAAN인 보존적 서열 (consensus sequence)을 가지는 열충격에 반응하는 전사인자인 HSE (heat shock element)를 가지고 있다 (도 3 참조). GCN-4와 AP-1은 활성산소종 등에 반응하는 것으로 알려져 있으며, 특히 AP-1은 보리 C-hordein 프로모터에서 질소에 반응하는 중요 요소로 알려져 있다 (Muller, M. et al., 1993). 아울러, 천연 SWPA2의 프로모터 영역에는 GCN-4가 세 부위에, AP-1이 두 부위에 존재한다. 특히, -1175와 -1163 사이에는 GCN-4와 AP-1이 역반복서열 (inverted repeat sequence)로 존재한다 (도 3 참조).

본 발명의 SWPA2 프로모터는 산화적 스트레스를 포함한 다양한 외부적 요인에 의해 발현이 강하게 유도되고 특히, 배양 세포에서 강하게 발현되므로 환경 스트레스 저항성 식물체의 개발과 형질전환 식물세포를 이용한 유용물질 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

본 발명의 SWPA2 프로모터는 스트레스에 의해 유전자의 발현을 효과적으로 유도할 수 있다. 이를 위하여 본 발명의 프로모터는 ABA, 메틸 자스모네이트, 상처, 저산소증, 활성산소증, 열 또는 질소에 의한 스트레스를 인식하는 인자들을 포함한다. SWPA2 프로모터는 이러한 특성을 이용하여 서열번호 2로 기재되는 염기서열 중 1 내지 1824번 또는 그것의 일부로 이루어지며, 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열 및 이것과 작동가능하도록 연결된 구조 유전자로 이루어지는 융합 유전자 구조물의 제조에 이용될 수 있다. 상기 융합 유전자 구조물은 SWPA2 프로모터 유전자에 유용물질의 생산과 관련된 구조 유전자를 연결하여 다양한 환경 스트레스 하에서 SWPA2 프로모터의 조절에 의해 유용물질을 발현하므로 유용물질 생산을 위한 형질전환체의 제조에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 상기 융합 유전자 구조물에 다양한 환경 스트레스에 대해 내성을 나타내는 유전자를 구조 유전자로 사용하게 되면 외부적인 스트레스가 가해질 경우 이에 대해 내성을 가지는 형질전환체의 제조에도 이용될 수 있다.

본 발명의 프로모터는 식물체 뿐 아니라 미생물에서도 작용가능하며, 따라서 형질전환 식물세포, 형질전환 식물체 및 이로부터 유래된 형질전환 캘러스, 형질전환 미생물, 형질전환 동물세포를 얻는데 이용될 수 있다.

아울러, 본 발명은 상기 SWAP2 포로모터를 이용하여 다양한 환경 스트레스에 의해 유용물질의 생산을 유도할 수 있는 형질전환체의 제조방법을 제공한다.

상기 형질전환체의 제조방법은 1) 서열번호 2의 염기서열 중 1 내지 1824번 또는 그것의 일부로 이루어지며, 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열과 이것과 작동가능하게 연결되며 유용물질을 코딩하는 DNA 서열로 이루어지는 발현벡터를 제조하는 단계; 2) 숙주세포에 상기 발현벡터를 도입하는 단계; 및 3) 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 선별하는 단계로 이루어진다.

본 발명의 방법에서 유용물질은 약리효과를 발휘하는 다양한 단백질이나 펩타이드, 형질전환체에 스트레스에 대한 내성을 부여하는 물질 등을 포함한다. 따라서 본 발명의 방법에 의해 유용물질을 생산할 수 있는 형질전환체 및 다양한 환경 스트레스에 내성이 있는 형질전환체를 제조할 수 있다.

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 좀더 상세하게 설명하고자 한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것 뿐, 본 발명의 범위가 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

〈실시예 1〉 퍼옥시다제 게놈 DNA 분석 퍼옥시다제 유전자 swpa2의 게놈 유전자를 찾기 위하여, 먼저 swpa2 (GeneBank Accession No. AF109124)가 고구마의 게놈 내에 존재하는 유전자임을 확인하고자 서던블럿 분석 (Southern blot analysis)을 실시하였다. 고구마 배양세포로부터 델라포타의 방법 (Dellaporta, Newsletter, 57, 26-29, 1983)에 따라 추출한 게놈 DNA 15 μ g을 제한효소 EcoRI, HinclI 및 HindIII로 절단하여 아가로즈 겔에 전기영동을 수행하였다. 상기 겔상의 게놈 DNA를 나일론 막에 전사한 후 swpa2 유전자 각각의 특이적인 3'-말단 비번역 영역을

32 P로 표지한 유전자 단편을 탐침으로 사용하여 혼성화 반응을 수행하였으며 그 결과를 도 1에 나타내었다.

도 1에 나타난 바와 같이, swpa2 유전자는 2개 이상의 밴드를 나타내어 서로 다른 게놈 내에 복수로 존재하는 유전자임을 알 수 있다.

〈실시예 2〉 퍼옥시다제 게놈 DNA SWPA2의 분리 및 염기서열 분석본 발명의 퍼옥시다제 유전자 swpa2를 게놈 내에 포함하는 게놈 DNA를 분리하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

고구마 게놈 DNA 라이브러리는 λ Blue STARTM BamHI Arms vector kit (Novagen사)를 이용하여 제조하였다. swpa2의 염기서열을 특이적으로 인식하는 프라이머 (primer)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 이로부터 합성된 0.5 kb 크기의 DNA 산물을

32 P로 표지하여 고구마 POD 게놈 DNA 라이브러리의 스크리닝에 이용하였다. 라이브러리 스크리닝은 Sambrook 등 (Molecular cloning: a laboratory manual 2ed. 1989)의 방법에 따라 실시하였으며, 3차 스크리닝을 통해 swpa2와 ORF

가 동일한 게놈 클론을 얻었고 이를 천연 SWPA2라 명명하였다.

천연 SWPA2는 전체 길이가 약 4 kb 정도인 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 가지며 3개의 엑손과 2개의 인트론 및 프로모터 영역으로 구성되어 있었다(도 2). 상기 엑손의 염기서열은 swpa2 cDNA의 염기서열과 완전히 일치하는 게놈 클론임을 확인하였다. 고구마 POD 게놈 클론은 2개의 인트론 중 특히 첫 번째 인트론이 737 bp로 다른 식물종이 100 내지 300 bp인 것에 비해 상당히 긴 인트론을 포함하고 있으며, 각각의 인트론은 5'쪽이 GT로 시작하고 3'쪽이 AG로 끝나는 GT-AG의 법칙을 따르고 있었다.

〈실시예 3〉 페옥시다제 게놈 DNA SWPA2의 프로모터 분석천연 SWPA2의 프로모터는 번역개시점의 상류로부터 -1824 bp까지의 영역에 해당하는 서열번호 2로 기재되는 염기서열로 구성된다(도 3). 상기 SWPA2 프로모터의 염기서열 상의 특성을 Computational Biology & Informatics Laboratory의 Transcription Element Search Software (TESS)를 이용하여 분석하였다.

염기서열 분석 결과, SWPA2 프로모터는 진핵생물 프로모터의 조절요소 (regulatory elements) 부위를 갖고 있음이 확인되었는데, 전사개시를 위한 TATA box가 존재하였으며 -895 위치에 CAAT box가 존재하였다. 전사조절 단백질의 부착부위로서 ABA, 메틸 자스모네이트 (methyl jasmonate), 자외선 (UV light), 상처 (wounding), 저산소증 (hypoxia) 등에 의해 조절되는 것으로 알려져 있는 (Williams, M. et al., 1992) G box는 NNNSACGTGNCM으로 기재되는 아미노산 서열을 가지는데 SWPA2 프로모터의 -445와 -455 위치에 이와 유사한 영역 (motif)이 존재하였다(도 3). SWPA2 프로모터 내의 G box와 전사개시점 사이에는 조직 특이적으로 발현되며 스트레스에 의해 발현이 유도되는 전사인자 (transcription factor)로 밝혀진 (Gidoni, D. et al., 1984) SP-1이 존재하고 있으며, 그 외에도 AAAATAA의 반복서열 (repeat sequence)이 6개 존재하였다.

또한, SWPA2 프로모터는 -1170와 -1188 사이에 AGAAN인 보존적 서열 (consensus sequence)을 가지는 열충격에 반응하는 전사인자인 HSE (heat shock element)를 가지고 있었다(도 3). GCN-4와 AP-1은 활성산소증 등에 반응하는 것으로 알려져 있으며, 특히 AP-1은 보리 C-hordein 프로모터에서 질소에 반응하는 중요 요소로 알려져 있다 (Muller, M. et al., 1993). 아울러, SWPA2 프로모터에는 증폭부위 (enhancer)로서 oct-1과 C/EBP beta가 존재하며, GCN-4는 세부위에, AP-1은 두 부위에 존재하고 있다. 특히, -1175와 -1163 사이에는 GCN-4와 AP-1이 역반복서열 (inverted repeat sequence)로 존재하고 있다(도 3).

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 SAP2 프로모터는 ROS를 비롯한 다양한 스트레스를 인식하는 인자들을 많이 포함하고 있어 환경 스트레스에 대해 내성을 가지는 내성식물체 개발에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

〈실시예 4〉 SWPA2 프로모터의 결실 돌연변이체 (deletion mutant) 제조본: 발명의 SWPA2 프로모터의 결실 돌연변이체를 제조하기 위하여, SWPA의 프로모터 영역을 Ex Taq polymerase (Takara사)와 서열특이적 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이때 프라이머는 서열번호 3 내지 7로 기재되는 상류쪽 프라이머와 서열번호 8로 기재되는 하류쪽 프라이머를 사용하였으며 상기 상류쪽 프라이머는 모두 Sall 제한효소 부위를 포함하고 있으며 하류쪽 프라이머는 BamHI 제한효소 부위를 포함하도록 제조되었다. 상기 프라이머 쌍의 PCR 반응에 의한 결실 크기는 각각 1824, 1314, 968, 602, 354 bp로 증폭되었다(도 4).

이로부터 얻은 PCR 산물을 제한효소 Sall/BamHI으로 절단한 후 바이너리 벡터로서 GUS 코딩 부분과 NOS 전사종결자 (terminator)를 포함하는 pBI101 플라스미드 벡터 (Clontech)에 상기 DNA 단편을 서브클로닝하였다. 이로부터 -1824, -1314, -968, -602, -354 결실구조 (deletion construction)를 포함하는 SWPA2 프로모터의 결실 돌연변이체 플라스미드 벡터 pBS1814, pBS1314, pBS968, pBS602 및 pBS354를 제조하였고 이를 이용하여 transit assay를 실시하였다.

〈실시예 5〉 담배 원형질체를 이용한 SWPA2 프로모터의 transit assaySWPA2 프로모터의 결실 돌연변이체를 이용한 transit assay를 하기와 같이 수행하였다. 우선, 담배 혼탁배양 세포 BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright yellow 2)를 이용하여 계대배양한지 3일된 세포를 2% 셀룰라제 R-10과 0.5% 마세로자임 (macerozyme)을 함유하는 효소액에 3시간 동안 처리하여 원형질체를 분리하였다. 여기에 상기 실시예 4에서 제조된 결실 돌연변이체 플라스미드 벡터를 가하여 폴리에틸렌 글리콜 방법을 이용하여 플라스미드 벡터를 세포 내로 도입시킨 후 25°C, 암상태에서 16시간 동안 배양하였다. 결실 돌연변이체 플라스미드 벡터를 포함하는 원형질체의 형광을 Jefferson 등의 방법 (Plant Mol. Biol. Ref., 5, 387-405, 1987)으로 측정함으로써, 프로모터의 활성을 GUS 단백질이 생산된 양으로써 계산하였다.

Transit assay 결과, SWPA2 프로모터 중 특히 -1314의 결실구조가 도입된 경우 CaMV 35S 프로모터를 사용한 경우 보다 약 30배 이상의 높은 GUS 활성을 나타내었다(도 5).

〈실시예 6〉 SWPA2 프로모터의 효모에서의 발현 SWPA2 프로모터가 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서도 발현되는지 조사하기 위하여 효모/대장균 셔틀벡터 (shuttle vector)인 YEp352 (Hill 등, 1986) 및 *S. cerevisiae* L3262를 숙주로 사용하였다. 실시예 4에서 제조된 GUS 유전자 및 전사종결신호 (NOS terminator)에 결합된 형태로 SWPA2 프로모터의 결실 돌연변이를 포함하고 있는 플라스미드 벡터 각각을 YEp352 벡터에 도입한 후 PEG 및 리튬 아세테이트를 이용한 효모 형질전환 방법을 이용하여 효모에 형질전환시켰다. 형질전환된 효모를 SD/URA

배지 (minimal SD base-Ura DO (drop out) supplement, Clontech)에서 배양하고, 실시에 5와 동일한 방법으로, 형질전환된 효모로부터 나타나는 형광을 측정하여 프로모터의 활성을 조사하였다.

그 결과, -1314의 결실구조, -1620의 결실구조 및 -1824의 결실구조가 도입된 형질전환 효모에서 CaMV 35S 프로모터 보다 각각 1.6배, 1.4배 및 8.4배 높은 GUS 활성을 나타내었다 (도 6).

〈실시에 7〉 형질전환 식물체와 배양세포에서 SWPA2 프로모터를 이용한 GUS 발현 〈7-1〉 식물재료 및 형질전환 식물체의 제조형질전환 식물체의 재료는 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*)를 사용하였으며, 상기 실시에 4에서 제조된 SWPA2 프로모터의 결실 돌연변이를 포함하는 플라스미드 벡터인 pBS1824 (-1824 결실구조) 및 pBS1314 (-1314 결실구조) 와 CaMV 35S 프로모터에 GUS 유전자가 결합된 pBI121을 도입한 아그로박테리움 투마파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404를 각각 상기 담배에 감염시켰다. 감염된 담배를 200 mg/l 가나마이신 및 300 mg/l 클라포란 (claforan)이 함유된 MS배지 (*Murashige T.* 등, *Physiol Plant*, 15, 473~497, 1962)에서 배양하여 형질전환 식물체를 선별하였고, 룻팅 (rooting)과 슈팅 (shooting) 과정을 거친 후 순화시켜 작은 화분에 옮겨 재배하면서 실험 재료로 사용하였다.

상기 형질전환 식물체 내에 SWPA2 프로모터의 결실 돌연변이가 도입되었는지 확인하기 위하여 서열번호 9 및 10로 기재되는 NPTII 프라이머 쌍과 서열번호 11 및 12으로 기재되는 프로모터 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였으며, PCR 반응은 NPTII 프라이머 쌍을 사용할 경우에는 95°C 1분, 65°C 1분, 72°C 1분에서 30회, 프로모터 프라이머 쌍을 사용할 경우에는 95°C 1분, 62°C 1분, 72°C 1분에서 30회 수행하였다. 그 결과, 형질전환 식물체에서는 NPTII 프라이머 쌍에 의한 0.7 kb의 DNA 절편과 프로모터 프라이머 쌍에 의한 1.0 kb의 DNA 절편이 검출되었으며 이로부터 상기 형질전환 식물체 내에 외래 유전자가 삽입되었음을 확인하였다.

본 발명에서 선별된, pBS1314 (-1314 결실구조)로 형질전환된 형질전환 담배 캘러스를 생명공학연구소 부설 유전자은행 (Korean Collection for Type Cultures)에 2000년 10월 16일자로 기탁하였다 (수탁번호: KCTC 0875BP).

〈7-2〉 형질전환 배양세포의 제조형질전환 배양세포를 제조하기 위하여, 실시에 〈7-1〉에서 유전자 도입이 확인된 형질전환 담배 식물체의 잎을 MS 기본배지에 0.1 mg/l BAP, 2 mg/l NAA, 30 g/l 수크로스를 포함하는 캘러스 유도배지에서 배양하여 캘러스를 유도하였으며, 이로부터 유도된 형질전환 담배 세포주로부터 혼탁배양을 확립하였다.

〈7-3〉 스트레스에 의한 형질전환 식물체에서의 GUS 발현 측정 외부적인 환경 스트레스에 의한 형질전환 식물체 내에서 SWPA2 프로모터의 발현양상을 조사하기 위하여 상기 형질전환 식물체에 상처를 주거나 H₂O₂를 처리하여 이로부터 유도되는 GUS 활성을 측정하였다.

우선, 상처에 의한 SWPA2 프로모터의 발현양상을 살펴보기 위하여 형질전환 식물체에 상처를 주고 GUS 활성을 측정하였다. 그 결과, CaMV 35S 프로모터-GUS 유전자를 포함하는 pBI121 벡터가 도입된 형질전환 식물체에서는 상처에 의한 GUS 발현량의 변화가 나타나지 않은 반면, pBS1824 벡터 및 pBS1314 벡터가 각각 도입된 형질전환 식물체에서는 상처 처리 3일 경과 후 GUS의 발현량이 증가하였다 (도 7). pBS1314가 도입된 형질전환 식물체의 경우에는 상처 처리에 의해 GUS의 발현량이 무처리구에 비해 약 3.6배 증가하였다. pBS1824가 도입된 형질전환 식물의 경우에는 상처 처리에 의한 GUS 발현량의 증가가 pBS1314보다는 낮았으나, 상처에 의해 GUS의 발현이 유도되는 것은 pBS1314와 유사한 경향을 나타내었다.

또한, 본 발명자들은 H₂O₂에 의한 SWPA2 프로모터의 발현양상을 확인하기 위하여, 성숙한 잎으로부터 직경 7 mm의 잎 조각 (leaf disk)를 취해 1 mM H₂O₂ 용액에 띄우고 연속광 하에서 배양하였다. 배양 후 GUS 활성을 측정하여 H

₂O₂에 의한 SWPA2 프로모터의 발현양상을 살펴보았다. 그 결과, 배양 48시간 경과 후 pBS1314가 도입된 형질전환 식물체의 경우에는 비처리구에 비해 약 58배 GUS 발현량이 증가하였고 CaMV 35S 프로모터 보다는 약 1.7배 높게 GUS 활성이 측정되었다 (도 7). pBS1824가 도입된 형질전환 식물체의 경우에는 H

₂O₂에 의해 GUS 발현량이 3.2배 증가하였으며, CaMV 35S 프로모터 보다는 1.2배 높게 GUS 활성이 측정되었다.

아울러, 퍼옥시다제 게놈 유전자 SWPA2의 프로모터 결실 돌연변이체가 도입된 담배의 형질전환 식물체에서 자외선을 조사한 후 유도된 GUS 활성을 측정한 결과, 배양 24시간 경과 후 pBS1314가 도입된 형질전환 식물체의 경우에는 비처리구에 비해 약 5.6배 GUS 발현량이 증가하였고 CaMV 35S 프로모터 보다는 약 1.2배 높은 GUS 활성이 측정되었다 (도 8). pBS1824가 도입된 형질전환 식물체에서도 자외선에 의해 2.5배 높은 GUS 발현이 측정되었다.

〈7-4〉 캘러스 및 혼탁배양에서의 GUS 발현본 발명의 퍼옥시다제 유전자 SWPA2 프로모터가 배양세포의 생장과 관련하여 그 발현이 조절되는지 조사하기 위하여 pBS1314, pBS1824 및 pBI121이 각각 도입된 형질전환 식물체로부터 유도된 형질전환 캘러스에서 GUS 활성을 측정하였다. 그 결과, pBS1314가 도입된 형질전환 캘러스는 pBI121이 도입된 형질전환 캘러스 보다 약 4배 높은 GUS 활성을 나타내었다 (도 10a 및 도 10b).

또한, 형질전환 캘러스에서 유도된 혼탁배양세포에서 GUS의 활성변화를 조사한 결과, pBS1314, pBS1824 및 pBI121이 도입된 형질전환 세포는 동일한 생장을 보여 배양 15일 경과 후 정체기에 도달하였다 (도 11a 및 도 11b). pBI121이 도입된 형질전환 세포에서의 GUS 활성은 세포의 생장시기에 무관하게 비교적 낮은 수준으로 일정하게 유지되었다. pBS1824이 도입된 형질전환 세포에서도 세포생장에 무관하게 일정한 수준의 GUS를 발현하고 있었으나, pBI121보다는 높은 발현량을 유지하였다. 반면, pBS1314이 도입된 형질전환 세포에서는 세포배양 5 내지 7일 사이에는 낮은 수준으로 GUS를 발현하다가 배양 7일 경과 후부터 GUS 발현량이 급격하게 증가되었고, 배양 15일 경과 후에는 최고의 발현량이 나타나 배양후기까지 유지되었다.

발명의 효과

본 발명은 고구마 배양세포로부터 환경 스트레스 조건에서 강하게 발현하는 신규의 퍼옥시다제 유전자 SWPA2 및 상기 유전자의 프로모터를 제공한다. 본 발명의 퍼옥시다제 게놈 유전자 SWPA2 프로모터는 각종 환경 스트레스를 인식하는 영역을 여러 부위 포함하고 있으며 형질전환 식물체로부터 목적하는 유전자를 발현시키기 위하여 일반적으로 많이 사용되고 있는 CaMV 35S 프로모터에 비해 트랜짓 분석 (transit assay)에서 30배 높은 활성을 나타내므로 상기 프로모터의 전체 또는 일부를 세포, 식물체, 미생물 및 박테리아 등의 형질전환체 개발에 이용하면 환경 스트레스에 대해 내성을 가지는 내성식물체 개발과 유용성분을 대량으로 생산할 수 있는 형질전환 생물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항1

서열번호 1로 기재되는 염기서열의 전체 또는 그것의 일부로 이루어지며, swpa2 염기서열 또는 그것의 변이체로 이루어지는 DNA 서열에 의해 코딩되는 퍼옥시다제를 코딩하는 게놈 유전자.

청구항2

서열번호 2로 기재되는 염기서열 중 1 내지 1824번 또는 그것의 일부로 이루어지며 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열.

청구항3

제 2항에 있어서, 상기 프로모터 활성이 환경 스트레스에 의해 유도되는 DNA 서열.

청구항4

제 3항에 있어서, 상기 환경 스트레스가 상처, 활성산소종, 열, 수분, 온도, 염, 대기오염, 자외선 또는 중금속에 의한 스트레스인 DNA 서열.

청구항5

서열번호 2로 기재되는 염기서열 중 1 내지 1824번 또는 그것의 일부로 이루어지며 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열 및 이것과 작동가능하도록 연결되며 유용물질을 코딩하는 DNA 서열로 이루어지는 DNA 구조물.

청구항6

제 5항에 있어서, 상기 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열은 ABA, 메틸 자스모네이트, 상처, 저산소증, 활성산소종, 열 또는 질소에 의한 스트레스를 인식하는 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 서열.

청구항7

- 1) 서열번호 2의 염기서열 중 1 내지 1824번 또는 그것의 일부로 이루어지며 프로모터 활성을 나타내는 DNA 서열 및 이것과 작동가능하게 연결되며 유용물질을 코딩하는 DNA 서열로 이루어지는 발현벡터를 제조하는 단계;
- 2) 숙주세포에 상기 발현벡터를 도입하는 단계; 및
- 3) 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 선별하는 단계로 이루어지는 스트레스에 의해 유용물질 생산이 유도되는 형질전환체의 제조방법.

청구항8

제 7항에 있어서, 유용물질은 약리효과를 발휘하는 다양한 단백질이나 펩타이드, 형질전환체에 스트레스에 대한 내성을

부여하는 물질인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항9

제 7항에 있어서, 상기 단계 2)의 숙주세포는 식물세포, 동물세포 및 미생물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항10

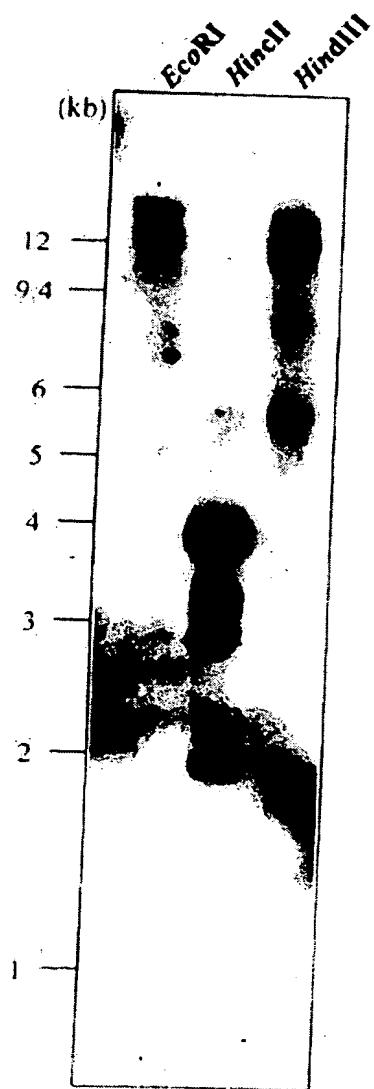
제 7항에 있어서, 상기 형질전환체는 미생물, 식물세포, 식물체 및 이로부터 유래된 캘러스로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항11

제 7항의 제조방법에 의해 생산된 형질전환 담배 캘러스 (수탁번호: KCTC 0875BP).

도면

도면1

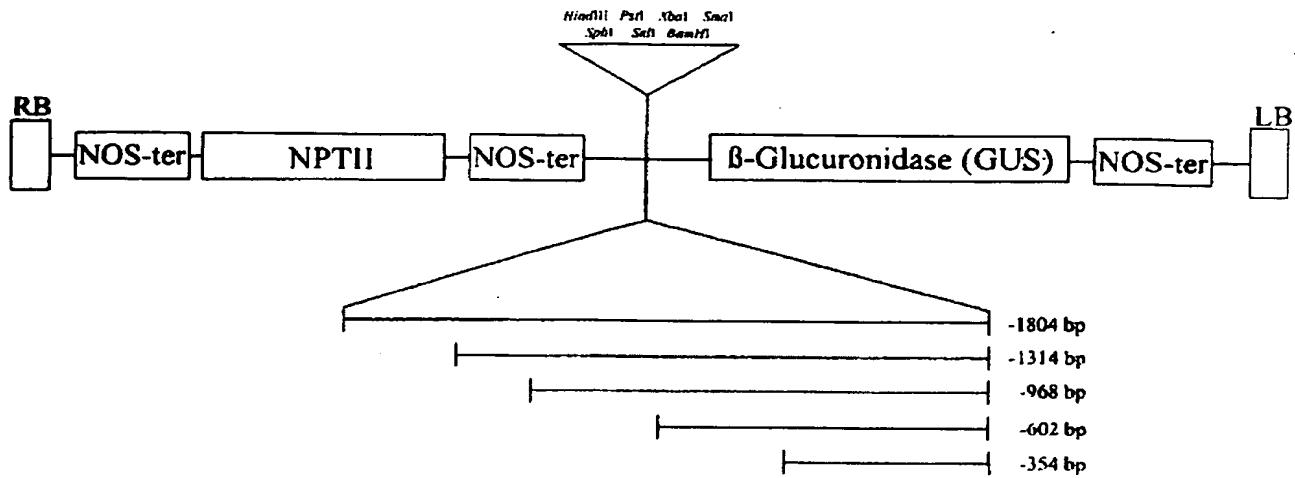


swpa2

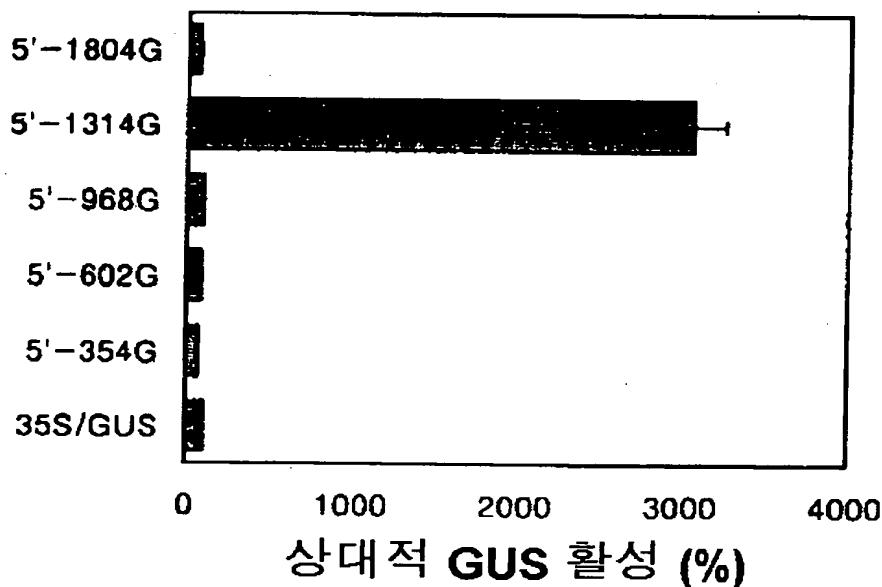
도면2a

도면2b

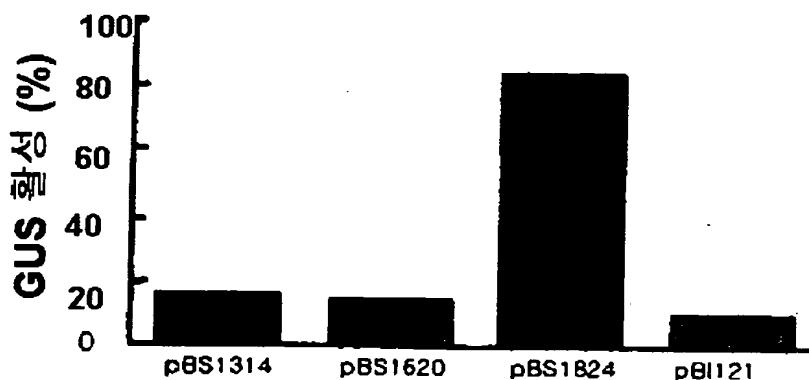
도면3



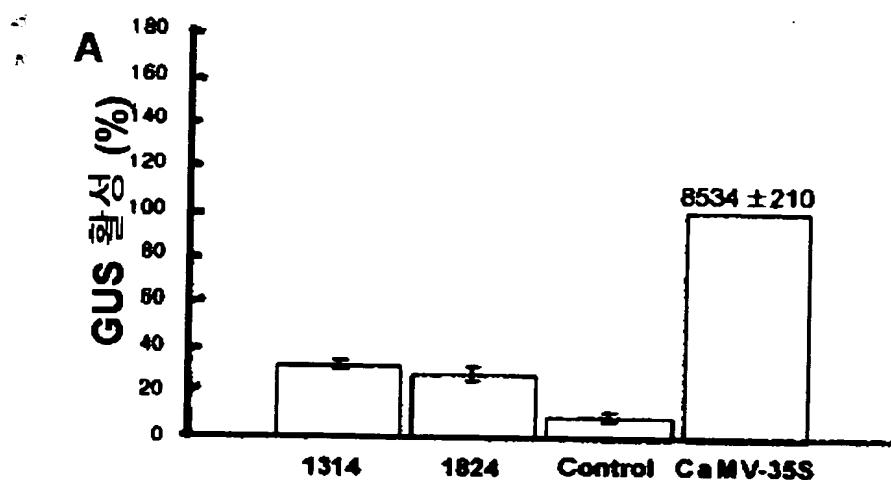
도면5



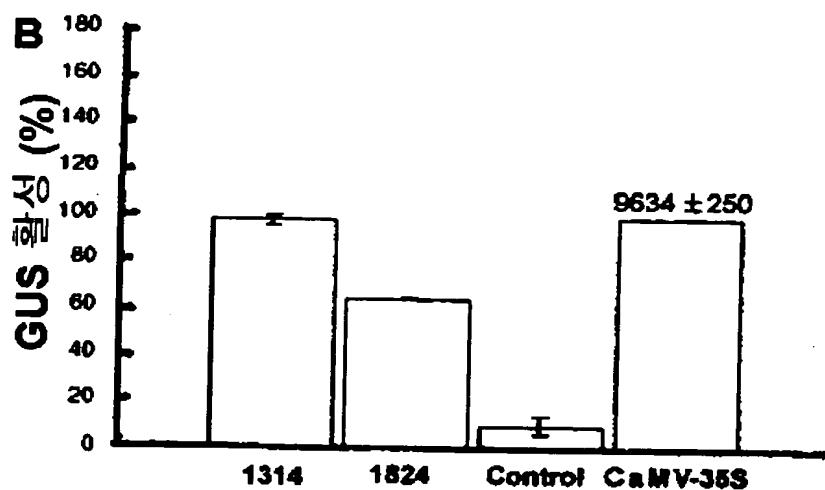
도면6



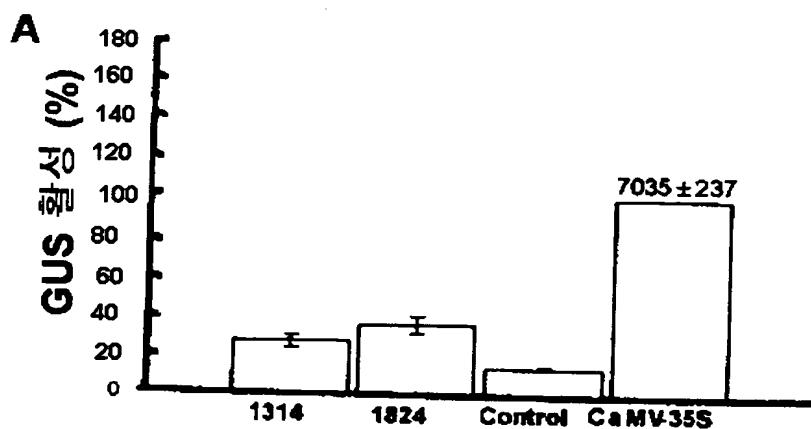
도면7a



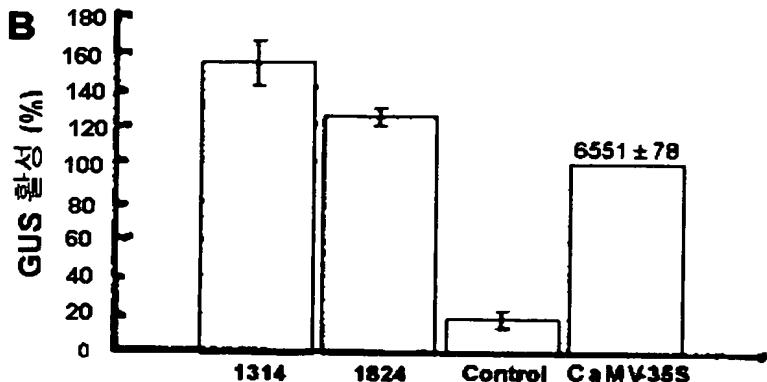
도면7b



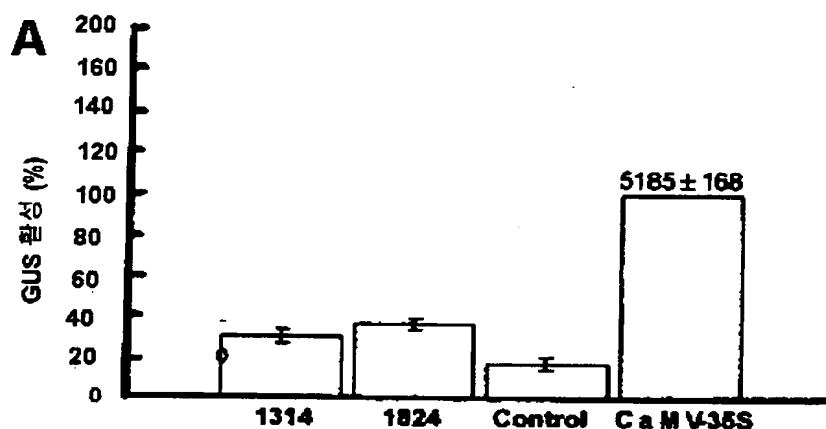
도면8a



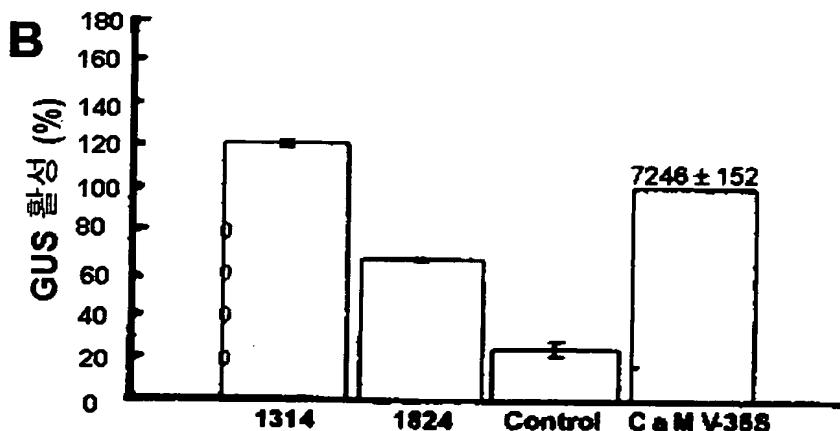
도면8b



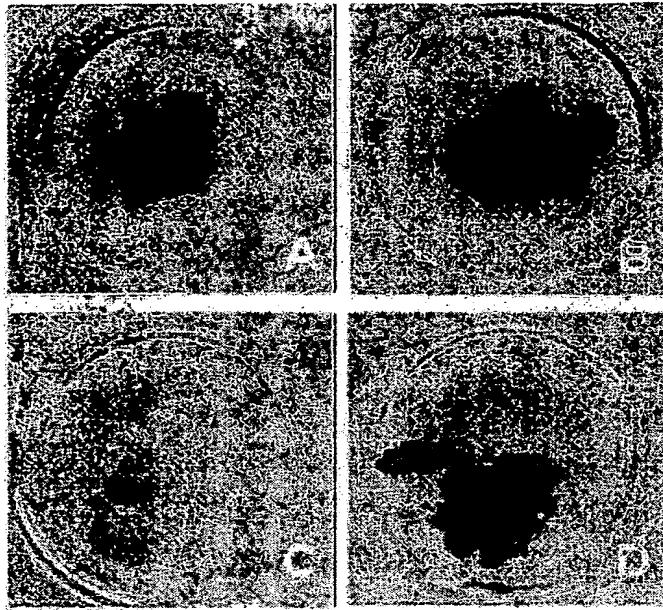
도면9a



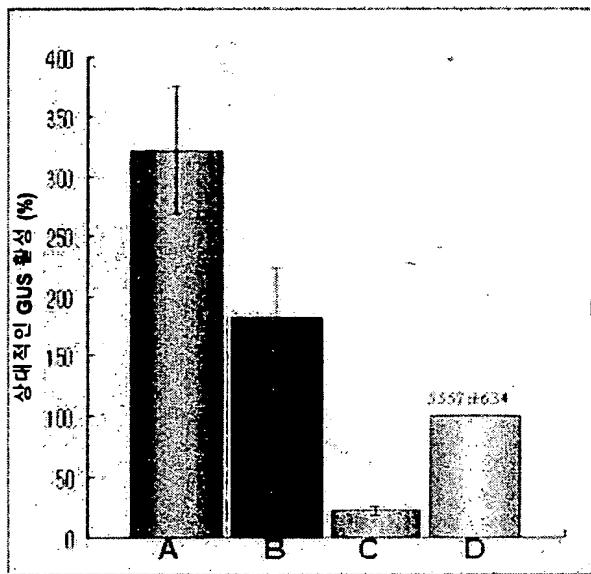
도면9b



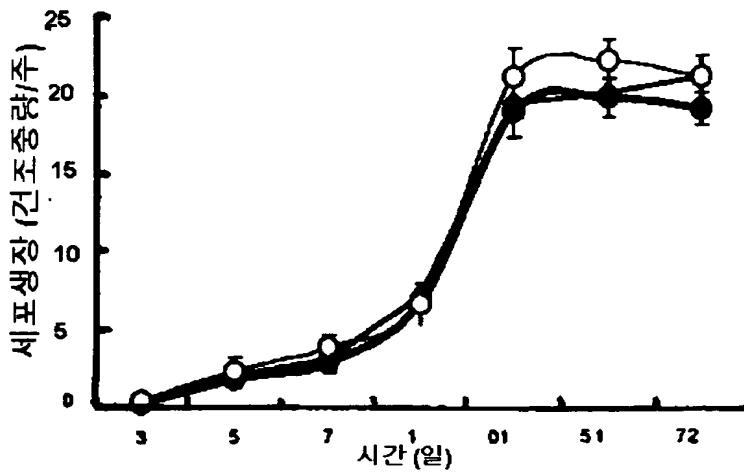
도면14



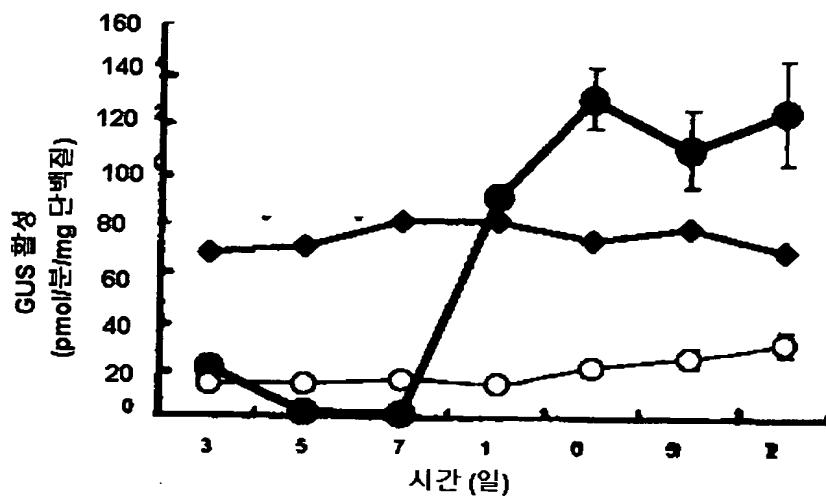
도면15



도면11a



도면11b



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.